

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE : TECHNOLOGIES ÉMERGENTES ET MARCHÉS DU FUTUR

Le club Biotechnologies a organisé une journée Ecrin sur ce thème le 17 septembre 2004, au ministère de l'économie, des finances et de l'industrie¹, pour faire le point sur les nouveaux microsystèmes (biopuces), leurs applications dans le secteur de la santé humaine et les marchés du futur que représentent le vieillissement de la population et les pays en développement.

Le diagnostic est en pleine évolution, non seulement au niveau technique, avec l'intégration progressive des technologies innovantes issues de la génomique et de la protéomique et la découverte de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de maladies, mais aussi au niveau économique, avec le développement du diagnostic préventif. Les chapitres ci-dessous reflètent les principaux points des interventions de cette journée.

Nouveaux micro-systèmes pour la biologie et la santé

Applications potentielles pour le diagnostic

Tel était le thème de la présentation de **François Chatelain**, responsable du laboratoire « Biopuces » au CEA. Ce laboratoire, qui s'est appliqué à

étudier et à améliorer les puces à ADN et à protéines, concentre maintenant ses efforts sur la recherche et le développement des biopuces à l'échelle de la cellule (cellulomique), qui permettront d'analyser le plus petit échantillon vivant qui soit. Jusqu'à présent, on s'attachait à l'observation moyennée sur un grand nombre de cellules, aujourd'hui on s'intéresse à une seule cellule, en tant que système biologique. Cette analyse est d'un grand intérêt pour la recherche biomédicale sur les cellules rares. Il serait très utile de typer toutes les cellules rares du cancer, ce qui permettrait une nouvelle connaissance des cellules et par conséquent une meilleure classification des cancers.

Des technologies nouvelles ont été développées, utilisant des principes physiques très différents, comme le champ électrique (diélectrophorèse), le champ acoustique ou les pinces optiques. Utilisant la diélectrophorèse, plusieurs montages sont

réalisés soit à partir d'une électrode pour une cellule dans un flux, soit à partir d'une matrice d'électrodes pour un piégeage de cellules sans flux. Ces techniques permettent les manipulations de cellules, fixes ou en mouvement, pour l'observation ou le tri cellulaire. Ces différentes techniques extrêmement fines, combinées entre elles, détectent des interactions très faibles de l'ordre du pico newton. On peut, par exemple, analyser ainsi les interactions cellule à cellule en immunologie, le transport de gènes en fluidique². On peut aussi intégrer des capteurs optiques ou électriques dans les parois de la biopuce, améliorant d'environ 80% le taux de récupération de cellules d'une population importante. L'asservissement électronique de nanogouttes permet la distribution des cellules incorporées dans celles-ci pour le tri cellulaire.

D'autres domaines sont concernés, comme l'électrophysiologie. Les canaux ioniques sont souvent

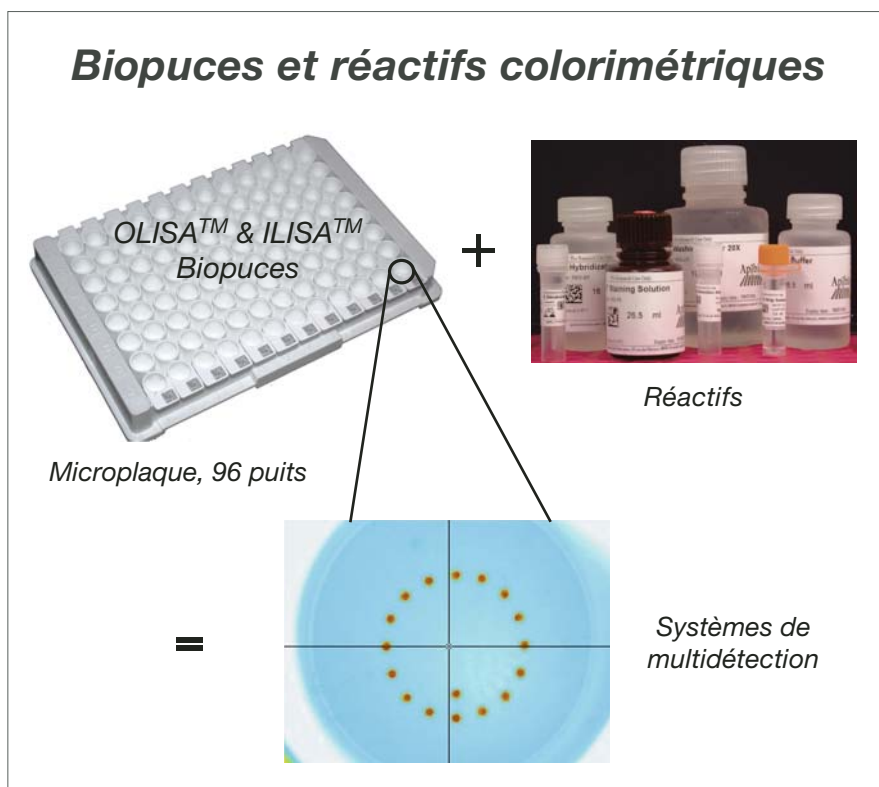
¹ Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie : *Minefi*.

² *Fluidique* : nanotechnologie d'utilisation des fluides.

représentés comme des marqueurs de l'activité électrique d'une cellule ; cependant bien peu sont identifiés. Ils sont spécifiques des ions et des cibles thérapeutiques, comme biomarqueurs d'une pathologie. La présence d'un ligand³ ou d'une différence de potentiel modifie leur activité physiologique. De nombreuses maladies, en effet, sont liées à l'état du canal ionique ; de même les médicaments ou produits administrés ont de fortes interactions avec eux. Le but est alors d'éviter les perturbations dues aux électrodes, par exemple celles de patch-clamp⁴, par un montage microélectronique sans contact avec les cellules. Les courants mesurés sont très faibles. On s'oriente ainsi de plus en plus vers des capteurs ultra-sensibles tels les capteurs synthétiques biomimétiques. Enfin, un progrès considérable est la diminution de l'épaisseur des membranes des éléments constituant le biocapteur qui, en quelques années, est passée de 300 à 13 nm. Les systèmes de demain seront les systèmes de monitoring implantés.

Développement de biopuces à ADN et immunoenzymatiques pour l'analyse haute cadence ou tests rapides pour le diagnostic

Comment appliquer plus rapidement la technologie au marché, sachant que la constante de temps d'application en routine des nouvelles technologies en matière de diagnostic a augmenté par rapport à nos espérances d'il y a 15 ans ? Une des solutions, présentée par **Philippe Cleuziat**, marketing manager chez Apibio, consiste à marier des techniques conventionnelles et des microtechnologies permettant une analyse à haut débit, associées un



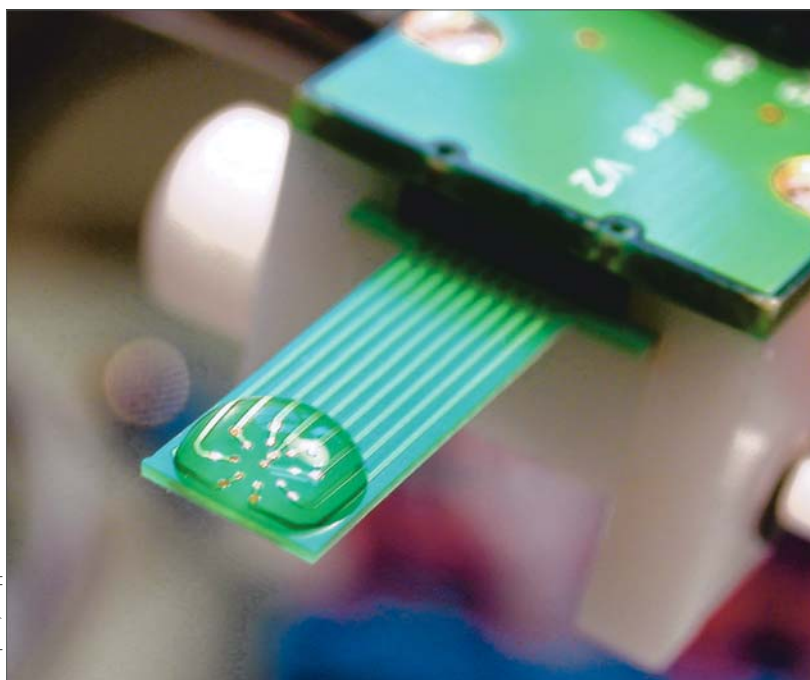
format plus traditionnel tel que la microplaque largement utilisée et à un mode de mise en œuvre proche de l'analyse immunologique classique (ELISA). Cette approche intéresse concrètement les domaines de la génomique et de la protéomique, afin d'augmenter les cadences d'analyse et de diminuer les coûts associés. En parallèle, nous développons à plus long terme des biopuces permettant une détection électrique directe d'acides nucléiques, d'antigènes ou anticorps. Cette évolution devrait permettre d'avancer vers des générations de tests « au chevet du patient » qui pourraient être utilisés à distance dans des environnements plus difficiles avec des détecteurs portables et communicants. Ces technologies permettent de trouver un compromis entre la quantité d'échantillon biologique disponible, la sensibilité de détection, la rapidité et l'exhaustivité d'un diagnostic.

Applications des biopuces en oncodiagnostic

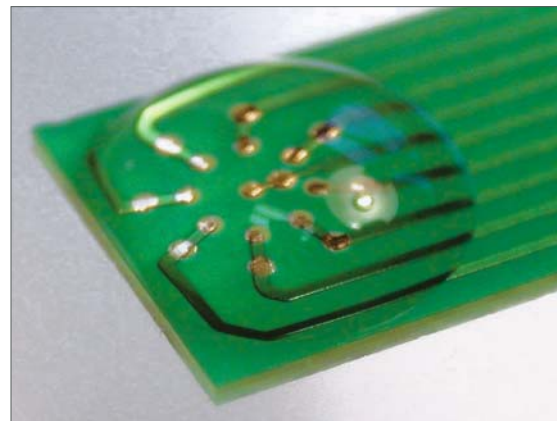
Un rapide tour d'horizon des acteurs de l'oncologie, présenté par **Vincent Fert**, président directeur général de la société Ipsogène, nous permet d'identifier les besoins à satisfaire. Le cancer est un problème de santé publique. Les économies de santé, face au coût du traitement très élevé, ne peuvent être résolues que grâce à un diagnostic plus informatif : quel traitement est le mieux adapté au patient ? Les médecins cherchent de nouvelles approches et de nouvelles améliorations dans la gestion de la maladie, en particulier le pronostic et la réponse aux médicaments. Les entreprises de biotechnologies et pharmaceutiques sont encouragées à introduire dans leur développement des biomarqueurs pour réduire les risques d'échec dans leur développement

³ **Ligand** : molécule pouvant se lier à un récepteur ou à un site spécifique sur une protéine.

⁴ **Patch-clamp** : technique d'étude des canaux ioniques.



Adressage électronique indépendant : lecteur portable.



Adressage électronique indépendant : échantillon d'une gouttelette de 30 μ l.

et améliorer l'efficacité de leurs nouvelles drogues. En additionnant tous ces besoins, le marché doit donc normalement se développer très fortement, on parle d'un marché d'un milliard de dollars en 2007. Les tests diagnostics sont de plus en plus utilisés en combinaison avec des médicaments selon le concept de « théranostics⁵ » ou « compagnon diagnostic ». Un autre point d'intérêt concerne les effets secondaires des médicaments avec l'aspect toxicité. L'analyse descriptive des cancers, qu'elle soit morphologique pour les cellules, ou moléculaire par l'utilisation de marqueurs spécifiques, présente une diversité technologique et biologique difficile à appréhender. Quelle technologie faut-il choisir parmi la diversité offerte ? Sur quels critères doit-on élaborer de nouveaux marqueurs qui répondent aux besoins des patients et à la demande du milieu médical. Une approche consiste à faire l'hypothèse que dans le transcriptome d'une tumeur primaire, il est possible d'identifier un profil d'expression prédictif qui contient des

informations sur l'évolution de la tumeur et notamment son agressivité. Beaucoup de marqueurs ont été testés indépendamment, mais très peu se sont révélés réellement utiles. Il faut combiner plusieurs marqueurs pour que l'information médicale soit efficace et significative car il existe beaucoup de gènes responsables de l'agressivité des tumeurs et de leur sensibilité aux médicaments. La tumeur primaire est-elle suffisante ? Notre option est l'identification de marqueurs associés en « signatures » pour classer les types de tumeurs et prédire les réponses aux médicaments. D'autre part, qu'est ce qui différencie les patients ? On peut tester les tumeurs soumises aux traitements antitumoraux standards. On analyse alors un profil d'expression très détaillé des gènes pour les différencier. Le défi technologique de la détection de marqueurs par biopuce est la robustesse, la spécificité et la sensibilité. Il faut manipuler de grandes quantités d'échantillons et faire des mesures d'expression quantitatives et fiables. Le but est d'obtenir une signature détectable

sans risques technologiques majeurs. L'objectif est de délivrer des tests robustes de diagnostic, accompagnés d'une liste de spécifications pour l'identification des marqueurs. Un test sur biopuce comporte une étape de traitement de l'échantillon, une étape d'hybridation, une étape de lecture des résultats (par exemple utilisant un signal colorimétrique) et enfin une étape d'analyse et de rendu du résultat. Il faut ajouter un module de d'extraction d'échantillons pour un kit de diagnostic complet.

Quelles conséquences sur le diagnostic ? Longévité et fragilité : émergence de nouvelles populations et de nouveaux problèmes de santé

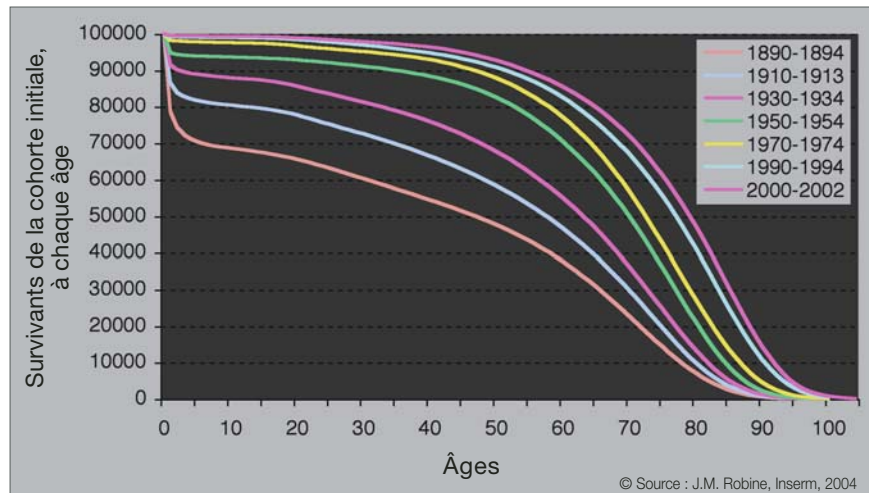
Jean-Marie Robine, démographe à l'Inserm, nous rappelle que depuis 160 ans, l'espérance de vie record augmente de 3 mois par an. La projection de cette tendance mène à

⁵ **Théranostics** : mise en commun de deux approches : l'une thérapeutique, l'autre diagnostique.

une espérance de vie de l'ordre de 100 ans en 2050. L'augmentation de l'espérance de vie conduit à la rectangularisation de la courbe de survie d'une population. Celle-ci est cependant moindre qu'attendu à cause de l'émergence d'une population très âgée au cours des 20 dernières années.

L'augmentation de la survie des personnes très âgées est liée à la diminution de leur mortalité. La diminution de la mortalité observée aujourd'hui chez les centenaires est comparable à celle observée chez les nouveaux-nés il y a plus d'un siècle. Si les taux de mortalité augmentent de façon exponentielle avec l'âge, alors, il y a une limite biologique à la longévité des espèces. Or, on s'aperçoit aujourd'hui que les trajectoires de mortalité ne correspondent plus aux modèles exponentiels pour les personnes très âgées. Cette discordance entre les modèles et les observations permet de dire qu'il n'y a plus de limite génétique au vieillissement. La seule limite est celle du taux de mortalité, et c'est lui qui s'effondre quand on modifie l'environnement des personnes âgées fragilisées.

L'absence visuelle de ce groupe de personnes très âgées fait que la société n'a eu aucune réflexion sur



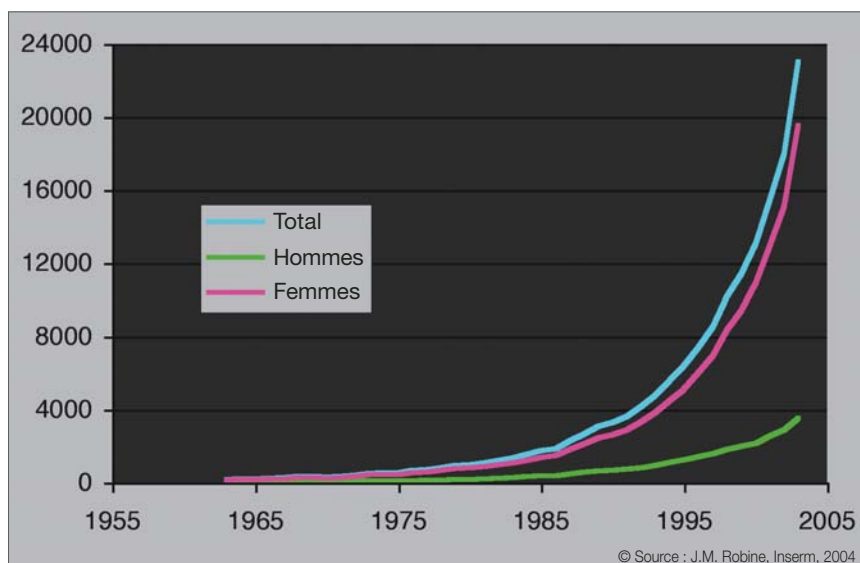
Rectangularisation de la courbe de survie en France au cours du 20^e siècle.

ce groupe à ce jour. Est-il utopique d'imaginer une société dans laquelle les personnes âgées resteraient actives et en bonne santé ? Dans le contexte démographique actuel de vieillissement de la population dans la plupart des sociétés industrialisées où la mortalité infantile est devenue très faible et où les maladies létales de l'âge adulte tendent à reculer, l'augmentation de l'espérance de vie ne semble pas céder. Dans le même temps, la chute des taux de natalité induit une inquiétude quant à la capacité des sociétés futures à prendre en charge leurs personnes âgées.

Briser le lien entre le grand âge et la mauvaise santé devient un défi à la fois économique et humanitaire. La recherche en gériatrie était jusqu'à présent principalement tournée vers le traitement des maladies, mais on reconnaît maintenant la nécessité d'étudier les facteurs génétiques et environnementaux qui permettent à certaines personnes de rester actives et en bonne santé jusqu'à un âge avancé. On cherche des marqueurs qui fassent apparaître une fragilité de ces personnes très âgées : ce pourrait être par exemple une réponse immunologique au stress.

La polyarthrite rhumatoïde : nouveaux marqueurs diagnostics et pronostics

Pierre Miossec, hôpital Édouard Herriot de Lyon, montre l'utilité des tests de diagnostic dans la polyarthrite rhumatoïde qui n'est pas uniquement liée au vieillissement mais qui atteint souvent des femmes de 40-45 ans. Elle est fréquente et grave. Cette pathologie entraîne une production de facteurs inflammatoires et un accroissement important du nombre de cellules. Cette accumulation de facteurs endogènes (génétiques) et exogènes est



Courbe des centenaires au Japon : ils étaient 18 000 en 2002.

responsable de cette pathologie. Existente-t-ils des marqueurs pour faire le diagnostic, pour fixer le pronostic et pour orienter le traitement de cette maladie ? Pouvons-nous, par un test diagnostic prévoir le passage d'un état précoce qui est bénin à un état tardif plus sévère de cette maladie ? Le $\text{TNF}\alpha^6$ est responsable d'une activité enzymatique, à l'origine de la destruction des articulations. Il faut donc bloquer celui-ci. Les outils, basés sur des applications physiologiques comme approches thérapeutiques sont l'utilisation, soit des anticorps, soit des récepteurs solubles. Cependant, malgré l'aspect bénéfique, clinique et mesurable du blocage du $\text{TNF}\alpha$, il existe un effet secondaire qui est le développement d'une infection. La notion d'épitope partagé, structure moléculaire qui permet une liaison avec les cellules, montre l'importance des marqueurs et du même coup, du polymorphisme chez les cytokines dont la détermination est simple et peut-être effectuée entre plusieurs populations. D'autres acteurs sont concernés notamment les cellules du sang circulant, stimulées par les cytokines (IL-12 ou IL-18) et responsables de la réaction de défense immunitaire, qui auront une réponse positive par rapport aux cellules non stimulées ou par rapport aux cellules des malades. Il y aura alors apparition d'un défaut de productions d'interféron γ et les bons répondeurs seront ceux qui peuvent corriger ce déficit. Les facteurs rhumatoïdes sont très spécifiques, ils sont responsables de la destruction cellulaire ou d'un défaut de la réparation tissulaire. Dans le plasma circulant de malades en contact avec les cellules d'articulation, après administration de $\text{TNF}\alpha$ ces cellules répondent par la sécrétion d'une cytokine. Cette réponse aux marqueurs est mesurable, prédictive et permet ainsi d'identifier les interactions entre

les matrices protéiques et la force nécessaire à la suppression de la liaison entre ces protéines. En mesurant très simplement la composition plasmatique avant le traitement, nous pouvons prédire la réponse à un traitement donné. On identifie trois acteurs dans le processus d'identification : les malades, les marqueurs avec les industriels du diagnostic et la réflexion sur le traitement avec les industriels du médicament.

Diagnostic biologique des maladies neuro-dégénératives : état des lieux et intérêt dans le contexte du vieillissement de la population

Armand Perret-Liaudet, de l'hôpital neurologique de Lyon, est intervenu sur la prédominance des démences qui est un problème de santé publique concerné par le diagnostic. Ce sont des maladies progressives, cognitives et comportementales conduisant à une diminution d'autonomie. Les critères de diagnostic des démences sont nombreux et sont classifiés par des études américaines notamment DSM4 1990-2000. Pour étudier ces pathologies, il existe une batterie de tests cliniques et neurophysiologiques qui sont principalement, des évaluations cognitives, des tests de mémoire, la réalisation de fonctions exécutives, des tests de langage. Il existe un état préclinique, étude PAQUID, qui est notamment la perte de mémoire et il serait intéressant d'avoir un test biologique prédictif à 3 ans pour éventuellement connaître son évolution. Quels sont alors les malades qui évolueraient vers la maladie d'Alzheimer ? Les tests cliniques, mis à notre disposition, ne sont pas assez spécifiques. Il nous

faut donc définir les avantages et les inconvénients de ces tests. Seule 40% des malades atteints d'Alzheimer sont identifiés comme tels. Quels sont les critères appliqués à ces tests ? Ils doivent être validés neuro-pathologiquement, être le reflet de la physiopathologie, détecter précocement la maladie et surtout être fiables, enfin être non invasifs et pas chers ainsi que très sensibles. Il existe des protéines immunoenzymatiques dans le liquide céphalo-rachidien comme la protéine tau, la protéine AB-42 et les protéines tau phosphorylé. Ce sont elles, qui pourraient déterminer la sensibilité et la spécificité des marqueurs dans la détection précoce de la maladie d'Alzheimer. Il est donc important avant toute chose de prendre en charge le malade le plus rapidement et le plus spécifiquement possible.

Quel diagnostic biologique pour les pays en développement ?

Michel Goudard, Biomérieux Lyon, nous propose une définition du diagnostic. C'est répondre aux besoins des malades, savoir qu'elle est la maladie ; le traitement donné est-il adapté aux malades ? est-il toxique ? C'est aussi répondre aux autorités sanitaires, est-ce une épidémie qui se développe, comment progresse-t-elle dans le pays et y a-t-il apparition d'une résistance ? Pour la tuberculose et le sida, nous dénombrons 7,5 millions de morts par an. Il existe un certain nombre de tests comme les réactions à la tuberculine, la radiologie, les examens de crachats qui ne sont spécifiques qu'à 60%, mais ils ne sont pas toujours utilisés car non adaptés au pays ou aux traditions. Il y a d'autres difficultés comme le recueil de l'échantillon qui est différent selon les pays et l'environnement, notamment pour

⁶ *TNF* : tumor necrosis factor.

⁷ *Mems* : acronyme anglais pour systèmes micro électro-mécaniques.

les automates qui demandent des accessoires indispensables. Il est important de prendre en compte le coût et la spécificité du test. Un test qui est spécifique dans un pays n'est pas forcément spécifique dans un autre pays. Le dernier point et non le moindre est le problème de la formation des personnels. Quelles seraient les caractéristiques d'un test idéal pour les pays en voie de développement ? Ils doivent être abordables, sensibles, spécifiques, faciles à utiliser, rapides et composés de peu d'éléments pour favoriser leur distribution. Il existe de nombreux tests rapides, beaucoup d'entreprises surtout asiatiques commercialisent ces tests mais souvent sans grande fiabilité. Pourquoi les industriels hésitent à entrer sur ce marché ? Le marché est volatil, très spécifique, il n'y a pas d'économie d'échelle, la mise en place des produits et des réseaux est lente et surtout ce marché n'est pas prioritaire. Les solutions passent par le financement des programmes, partagé avec les organisations internationales ; les nouvelles approches biologiques doivent mieux identifier les interactions entre les facteurs pathogènes et l'hôte et les nouvelles voies technologiques que sont les Mems⁷ doivent être plus utilisées. Le rôle des nouvelles technologies de l'information doit être accentué pour une plus grande rapidité de transfert d'information.

Diagnostic dans les pays du sud : exemple du VIH en Afrique

Stéphane Garcia, responsable de zone export Bio-Rad, nous a expliqué que l'on retrouve pour le

diagnostic du VIH les mêmes problèmes communs aux différents pays, c'est-à-dire un problème de formation et de réglementation sur les produits. Il faut un minimum d'équipement, celui-ci est souvent obsolète. Les tests de dépistage doivent être caractérisés par un spectre de détection des variants le plus large possible, mais ces tests étant fabriqués par des sociétés européennes ou américaines, les normes de largeur de spectre ne sont pas identiques entre ces différents pays. Quels sont ces besoins ?

Il faut des tests rapides avec peu d'étapes, faciles à utiliser ou des équipements d'entretien simple à des coûts faibles avec des demandes d'information très fortes. Cependant le contexte évolue. Hier, le suivi clinique était avant tout administratif. Les cas étaient catalogués mais pas diagnostiqués. Aujourd'hui, la méthode de surveillance est actuellement repensée notamment par l'OMS.

Conclusion

Le mariage entre les deux mondes, d'une part, les biologistes, les personnes du diagnostic, et d'autre part, les technologues, nous permet une réflexion sur les nouveaux concepts à développer. Cependant l'éclatement des petites structures, laboratoires, entreprises, acteurs du marché, est un frein à la concurrence. Chaque groupe étant leader sur son marché, il serait bon de se regrouper. C'est déjà en cours dans la région de Grenoble où la création d'un nanobiopôle comme nano2life est en voie de réalisation. Ce pôle est

un réseau d'excellence européen. Un exemple de collaboration, entre représentants du monde industriel et du monde académique, serait la création d'un groupe de réflexion sur l'étude des cellules rares. Quelles seraient les briques de base à élaborer pour développer de nouvelles technologies afin d'en faire un outil de diagnostic. Le problème majeur est la limite de la taille critique. La nécessité d'un partenariat semble faire l'unanimité des intervenants pour élaborer des stratégies de développement. L'initiative d'une telle réunion est venue après le constat qu'en France le diagnostic est moribond et malgré un fort pouvoir potentiel de croissance, il mérite d'être aidé notamment par le Minefi. C'est surtout vrai pour le domaine industriel et non pas scientifique. Ce secteur pionnier, n'est pas considéré comme rentable par les banquiers, ce qui pose le problème du financement des jeunes pousses en matière de nouvelles technologies, suite aux échecs des entreprises de biotechnologies des dernières années. Quelles sont les ruptures technologiques identifiées, que les industriels attendent et qui font que le transfert se fait mal. Il existe pourtant des domaines d'excellence qui regroupent des industriels et des organismes publics comme l'optique, la cosmétique valley. La seule possibilité pour réaliser de gros investissements est la nécessité de faire des choix précis et d'éviter tout saupoudrage financier.

*Dominique Von Euw, Ecrin
von_euw@ecrin.asso.fr*



En complément de ce dossier vous trouverez une synthèse documentaire réalisée par l'Inist à cette adresse :
<http://www.inist.fr/ecrin>